

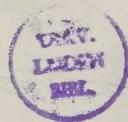
**POSTMORTALE KOAGULATION
UND FIBRIN(OGEN)OLYSE IM BLUT
UND IN DER PERICARDFLÜSSIGKEIT**

RAINER SCHÖNBAUER

1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0027

Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum
Großhadern der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Wilmanns

POSTMORTALE KOAGULATION UND FIBRIN(OGEN)OLYSE
IM BLUT UND IN DER PERICARDEFLÜSSIGKEIT

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Schönbauer
aus
Ingolstadt

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. W. Wilmanns
 2. Prof. Dr. J. Wilske

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. W. Schramm
 2. Prof. Dr. H. Fritz

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. W. Klaubert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. BIOCHEMISCH/PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1. Fibrinogen	4
2.2. Blutgerinnung	6
2.3. Fibrinolyse und Fibrinogenolyse	8
2.4. Elastase	12
2.5. Fibronektin	13
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1. Gerinnbares Protein	17
3.2. Fibrinopeptid A (FPA)	18
3.3. F-CB3	19
3.4. Staphylokokken-Clumping-Test	19
3.5. DD	20
3.6. Laser-Nephelometrie	21
3.7. AT III funktionell	22
3.8. Elastase	24
3.9. pH	26
3.10. Statistische Auswertung	26

3.11.	Immunadsorption	26
3.12.	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	28
3.12.1.	Elektrophoresen-Ansatz	28
3.12.2.	Färben der Gele	29
3.12.3.	Densitometrische Auswertung	30
3.12.4.	Molekulargewichtsbestimmung unbekannter Proteine	30
3.14.	In vitro Simulation	31
4.	ERGEBNISSE	32
4.1.	Gerinnbares Protein	32
4.2.	Fibrinopeptid A (FPA)	32
4.3.	F-CB3	33
4.4.	Staphylokokken-Clumping-Test (FSP)	33
4.5.	DD	34
4.6.	AT III und Laser-Nephelometrie	34
4.7.	Elastase	36
4.8.	pH	37

4.9.	Elektrophoresen	38
4.9.1.	Fibronektin-Material	38
4.9.2.	Fibrin(ogen)-Material	39
4.9.2.1.	Fibrin(ogen)-Material aus geronnenem Leichenblut	40
4.9.2.2.	Fibrin(ogen)-Material aus flüssigem Leichenblut	41
4.9.2.3.	Fibrin(ogen)-Material aus Herzbeutelflüssigkeit	42
4.9.2.4.	Reduziertes Fibrinogen-Material	44
4.9.2.5.	In vitro Simulation	46
5.	DISKUSSION	50
6.	ZUSAMMENFASSUNG	58
7.	LITERATUR	61

1. EINLEITUNG

Die Beobachtung, daß Blut nach akutem Todeseintritt bzw. raschem Kreislaufstillstand bei kurzer Agonie in der Leiche vorwiegend flüssig und nach langer Agonie meist geronnen vorgefunden wird (1,8,9,10,57,67,92, 128), hat seit ca. 100 Jahren zu eingehenden wissenschaftlichen Untersuchungen der postmortalen Gerinnung und Fibrinolyse geführt. Bis heute liegt jedoch kein schlüssiges Konzept der postmortal ablaufenden Gerinnungs- und Fibrin(ogen)olyseprozesse vor.

In den ersten postmortalen Stunden tritt in vitro noch Gerinnung von Leichenblut mit nachfolgender Wiederauflösung der Gerinnsel ein; nach Ablauf von 6-8 Stunden gerinnt Leichenblut nicht mehr (10,55,57). Zur Erklärung dieser Beobachtungen wurden im wesentlichen zwei unterschiedliche Theorien aufgestellt.

Die sogenannte Dekoagulationstheorie wurde 1889 von Brouardel und Loye (19) begründet und später vor allem von Berg (8) und Harms (57) vertreten. Diese Theorie besagt, daß die Entstehung von flüssigem Leichenblut

auf einer vollständigen postmortalen Gerinnung des Fibrinogens mit nachfolgender partieller oder totaler Wiederauflösung des Fibrins beruht (6,19). Andere Theorien, wie sie z.B. von Schleyer vertreten werden (114), gehen von einer postmortal einsetzenden kompletten Fibrinogenolyse aus, die zur Defibrinogenierung und damit zur Ungerinnbarkeit des Leichenplasmas führt (67). Keine dieser Theorien konnte bis jetzt hinreichend belegt werden.

Bei plötzlichem Tod mit kurzer Agonie wurde eine hohe fibrinolytische Aktivität des Leichenplasmas beobachtet (1,8,30,47,55,56,57,75,89,92,123,127,129,132,133). Der Mechanismus der postmortalen Fibrinolyseaktivierung ist noch nicht endgültig geklärt. Berg (8) und Habara (47) fanden einen engen Zusammenhang zwischen der Höhe der Katecholaminspiegel und der Intensität der Fibrin(ogen)olyse im Leichenblut (siehe auch 1,9,70,81,123). Dabei bewirken die Katecholamine offensichtlich eine Freisetzung von Plasminogenaktivator aus der Intima der Venenwand (3,11,22,71,97,111,117,119,126). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß diese aus Tierexperimenten gewonnenen Erkenntnisse nur mit Einschränkungen direkt auf den Menschen übertragen werden dürfen (20,23,24,32,60,82,97,102,109,124).

Unbestritten ist in der Literatur ein postmortaler Fibrinogenschwund und ein hoher Gehalt an Fibrin(ogen)-Spaltprodukten (FSP) im Leichenplasma (57,88,110,123). Eine Differenzierung der FSP in Abbauprodukte der Fibrinogenolyse oder Fibrinolyse ist bisher nicht erfolgt (123). Sie erscheint aber von großem Interesse, da sie Aufschluß über die Pathogenese des flüssigen oder geronnenen Leichenplasmas erwarten läßt.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb die postmortale Koagulation und Fibrin(ogen)olyse im flüssigen und im geronnenen Leichenplasma untersucht. Mit Hilfe von elektrophoretischen Auftrennungen wird zwischen Fibrinogen- und Fibrinabbauprodukten unterschieden (46). Postmortal ablaufende Koagulation und Fibrin(ogen)olyse werden zur besseren Interpretation der gefundenen Ergebnisse in in vitro Versuchen simuliert.



2. BIOCHEMISCH/PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Fibrinogen

Blutgerinnung und Fibrinolyse stehen in einem physiologischen Gleichgewicht. Eine zentrale Stellung besitzt hierbei das Fibrinogen. Es wird in den Leberparenchymzellen synthetisiert. Seine Konzentration im menschlichen Plasma beträgt 200 - 400 mg/dl. Seine Halbwertszeit beträgt 2,4 - 4 Tage (21). Bei der elektrophoretischen Trennung der Plasma-Proteine liegt Fibrinogen zwischen der β - und der γ -Globulin-Fraktion. Sein Molekulargewicht beträgt 340 KD (21,85). Die vollständige Primärstruktur ist bekannt (16,25,63).

Fibrinogen besteht aus dimer angeordneten identischen Hälften, die jeweils aus 3 Polypeptidketten bestehen (14). Diese werden durch Disulfidbrücken untereinander verbunden. Die 2 Hälften des Moleküls sind durch 3 Disulfidbrücken miteinander verknüpft (15,17). Insgesamt werden die 6 Peptidketten des Fibrinogens durch 29 Disulfidbrücken zusammengehalten (61,62). Das Molekül kann durch die Formel $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$ wiedergegeben werden. In dieser Formel entspricht A dem Fibrinopeptid A (MW 1537) (95) am amino-terminalen Ende

der α -Kette, und B einem etwa gleich großen Fibrino-
peptid B (FPB) an der β -Kette.

Durch Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen werden die
Fibrinopeptide A und B abgespalten (14) und es entsteht
Fibrin mit der Struktur $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ (18,96). FPA ist
deshalb ein guter Parameter für abgelaufene Thrombin-
aktivität (95). Durch Spaltung der Disulfidbrücken
(z.B. nach Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol) können die
Polypeptidketten A α , B β und γ voneinander getrennt
werden (87). Mit Hilfe von Polyacrylamid-Elektro-
phoresen der Polypeptidketten in Gegenwart von Natrium-
Dodecylsulfat (SDS-PAGE) können für A α 64 KD, für B β 57
KD und für γ 48 KD ermittelt werden (18,44,103).

1959 entwarfen Hall und Slayter ein Modell des
Fibrinogen-Moleküls, dem die elektronenmikroskopischen
Bilder der Autoren zugrunde lagen und dem auch die
Ergebnisse verschiedener physikochemischer Analysen
weitgehend entsprachen. Danach hat das Fibrinogen-
Molekül eine Struktur, ähnlich drei linear angeordneten
Kugeln (65 Å, 50 Å, 65 Å), die durch dünne Verbindungs-
stege zusammenhängen. Für die Länge des Moleküls
ergaben sich 475 ± 25 Å und für die Breite 50 - 70 Å

(54). Dieses Modell wurde mehrfach angezweifelt und andere Formen, wie z.B. von Bachmann (4) eine zylindrische Form angegeben. In den letzten Jahren wurde aber das ursprüngliche Modell von Hall und Slayter durch mehrere Autoren bestätigt und ist allgemein anerkannt (25,31,108,118).

2.2. Blutgerinnung

Die Umwandlung des im Plasma gelösten vorliegenden Fibrinogens in Fibrin erfolgt durch die thrombin-induzierte Lyse des Fibrinogens. Die Aktivierung von Thrombin erfolgt durch die Gerinnungskaskade, entweder über das Intrinsic oder über das Extrinsic System. Sowohl das Extrinsic wie auch das Intrinsic System führen zu der Bildung des Faktors Xa. Dieser bewirkt (über Faktor V und Calcium) die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

Bei der limitierten Proteolyse von Fibrinogen werden von der A α - und der B β -Kette 2 kleine Peptide abgespalten. Die dabei entstehenden Fibrinmonomere lagern sich schließlich zu Polymeren, dem sogenannten

löslichen Fibrinogen aneinander. Thrombin aktiviert gleichzeitig Faktor XIII, der schließlich zur Quervernetzung der Fibrinmonomere im Bereich der α - und τ -Kette führt (131).

Im Plasma existieren Proteinaseinhibitoren. Der wichtigste Inhibitor für die Gerinnung ist das α_2 -Globulin Antithrombin III (AT III), während α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin eine geringere Rolle spielen (79). AT III ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 62 KD und einer Plasmakonzentration von 0,3 g/l. AT III wird hauptsächlich in der Leber produziert. Seine Halbwertszeit beträgt 3 Tage. AT III neutralisiert die aktivierten Serinproteasen IIa (Thrombin), Xa (Stuart), IXa (Christmas), XIa (Plasmatromboplastin), XIIa (Hageman) und Kallikrein durch Bildung von inaktiven Komplexen mit diesen Faktoren. Heparin beschleunigt abhängig von der Konzentration die Inaktivierung um ein Vielfaches. Vermutlich ändert Heparin die Konformation von AT III und erleichtert so die Komplexbildung vor allem mit Thrombin. Deshalb kann eine Heparin-Behandlung bei niedrigem AT III - Gehalt des Plasmas unwirksam sein (90).

2.3. Fibrinolyse und Fibrinogenolyse (Abb. 1)

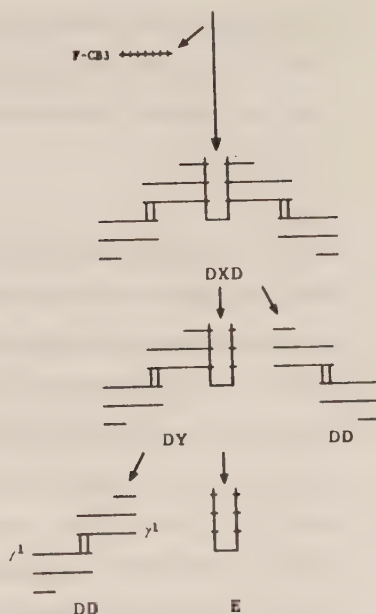
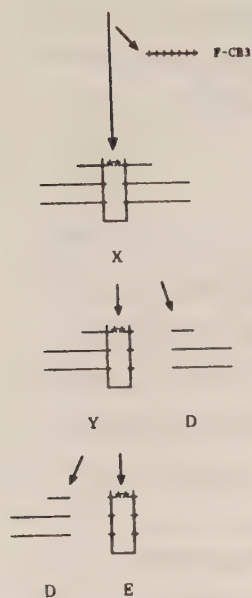
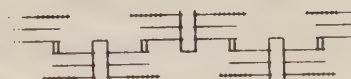
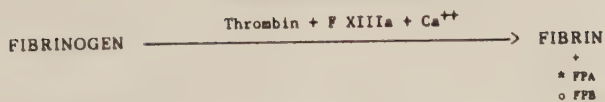
Der Abbau von Fibrin erfolgt in vivo vorwiegend durch die Serinprotease Plasmin. In geringerem Umfang kommt es auch zum Abbau von Fibrinogen. Plasmin wird ähnlich dem Extrinsic und dem Intrinsic System der Blutgerinnung durch Aktivatoren aus dem Gewebe oder dem Blut aus dem inaktiven Vorläuferprotein Plasminogen (MW 85 KD) aktiviert (74,93,125).

Zu den wichtigsten Plasminogenaktivatoren gehören Streptokinase und Urokinase.

Die von hämolytischen Streptokokken produzierte Streptokinase wird für therapeutische Zwecke bei Thrombosen eingesetzt. Sie verbindet sich mit Plasminogen zum Aktivator, der andere Plasminogenmoleküle zu Plasmin umwandelt. Urokinase ist ein physiologisch auftretender Plasminogenaktivator und kann aus menschlichem Urin gewonnen werden. Auch Urokinase wird für therapeutische Zwecke verwendet.

Der Abbau von Fibrin beginnt im Bereich exponierter Teile, nämlich im C-terminalen Bereich der α - und im N-terminalen Bereich der β -Kette (78).

COAGULATION



FIBRINOGENOLYSE

FIBRINOLYSE

Abb.1: Schematische Darstellung von Koagulation, Fibrinogenolyse und Fibrinolyse

Die beim Fibrin bestehende Quervernetzung der α -Ketten wird durch Plasmin nicht gespalten. So entstehen beim Fibrinabbau hochmolekulare Abbauprodukte (HMW) wie DXY (MW 485 KD), DXD (MW 440 KD), XY (MW 400 KD), DX (MW 340 KD), YY (MW 290 KD) sowie die Endabbauprodukte DY (MW 240 KD) und DD (MW 185 KD) (33,34,40,42,46,50,52, 76,84,104).

Wird Fibrinogen durch Plasmin abgebaut, so entstehen ebenfalls zuerst am C-terminalen Ende der A α -Kette Bruchstücke mit Molekulargewichten zwischen 19 KD und 45 KD. Der weitere Abbau des Fibrinogen führt zu dem Fragment X (MW 240 KD), das in je ein Fragment D (MW 95 KD) und je ein Fragment Y (MW 155 KD) abgebaut werden kann. Das Y kann in ein weiteres D und in die Kernregion E (MW 50 KD) gespalten werden, so daß aus einem Molekül Fibrinogen schließlich 2 Moleküle D und ein Molekül E entstehen können (18,35,38,76,80,83,86,103, 104). Aufgrund unterschiedlicher Spaltung entstehen verschieden große Bruchstücke D (MW 80-100 KD) (36,37, 105).

Nach Reduktion des Fibrinogens lassen sich je nach Intensität des erfolgten Abbaus folgende Kettenbruch-

stücke nachweisen: α (69 KD), α^1 (25 KD), α^2 (13 KD), β (56 KD), β^1 (53 KD), β^2 (44 KD), γ (49 KD), γ^1 (42 KD), γ^2 (37 KD) und γ^3 (25 KD). Bei der Reduktion von quervernetztem Fibrin fallen die oben genannten Produkte sowie die quervernetzten Abbauprodukte $\gamma\gamma$ (97 KD), $\gamma\gamma^1$ (MW 88 KD) und $\gamma^1\gamma^1$ (MW 79 KD) an.

Fragment X und seine Vorstufen sind noch gerinnungsfähig (nur abgebaute α -Ketten), während bei Fragmenten mit nicht intakten $\beta\beta$ - und γ -Ketten keine Gerinnselbildung mehr möglich ist (18). Die Fibrinogen-Spaltprodukte besitzen ihrerseits antikoagulatorische Wirkung (7,105).

In einer Polyacrylamid-Elektrophorese mit Zusatz von Natrium-Dodecylsulfat (SDS-PAGE) können die einzelnen Abbauprodukte als singuläre Banden dargestellt werden. Durch den Nachweis von DD (41) bzw. anderer quervernetzter Fibrinabbauprodukte sowie von $\gamma\gamma$ -Ketten (105,115) im reduzierten Fibrin(ogen)-Material kann bewiesen werden, daß eine Lyse quervernetzten Fibrins vorliegt. Somit kann zwischen Fibrinogenolyse und Fibrinolyse unterschieden werden (41).

2.4. Elastase

Fibrin(ogen) kann auch durch die in menschlichen Leukozyten vorkommende Elastase gespalten werden. Dabei werden Spaltprodukte mit Molekulargewichten von 240 KD, 120 KD, 68 KD, 45 KD und 15 KD beobachtet (12,76,101, 106,121,122).

Die Elastase ist ein lysosomales Enzym, das in den azurophilen Granula der Leukozyten nachgewiesen wird. Die Elastase liegt in 3 bis 4 immunologisch gleich reagierenden Isoenzymen vor. Das Molekulargewicht beträgt etwa 30 KD. Elastase löst natives Elastin und Proteoglycan auf, zeigt aber auch fibrinolytische Aktivität (99,106,107).

Eine große Rolle spielt die Leukozyten-Elastase beim Abbau phagozytierten Materials innerhalb der Zellen. Nach Freisetzung in den extrazellulären Raum wird die Leukozyten-Elastase durch körpereigene Inhibitoren gebunden und inaktiviert. Der wichtigste Inhibitor ist das α_1 -Antitrypsin, das mehr als 92 % bindet. Die Messung des Elastase- α_1 -Antitrypsin-Komplexes

erlaubt deshalb Rückschlüsse auf die freigesetzte Elastase (26).

2.5. Fibronektin

Fibronektin wurde unabhängig voneinander in verschiedenen Formen im menschlichen Körper gefunden (2). Deshalb hatte es verschiedene Namen, bevor man sich auf die einheitliche Bezeichnung Fibronektin einigen konnte. Früher hieß es z.B. LETS-Protein, lösliches Fibroblasten-Antigen (SF-Antigen), Zelloberflächenprotein (CSP), Zelladhäsionsfaktor (CAF), Galactoprotein a, Z, kalteunlösliches Globulin (CIG), Opsonin-Protein, zellüberziehender Faktor oder Anti-Gelatine Faktor (66,100).

Die zuerst als kalteunlösliches Globulin (CIG = cold insoluble globulin) isolierte lösliche Form des Fibronektins liegt im Plasma in einer Konzentration von etwa 300 µg/ml vor (68). Bildungsort des Fibronektins ist die Leber. Zusätzlich wird Fibronektin in Endothelzellen und Fibroblasten synthetisiert.

Fibronectin ist ein dimer aufgebautes Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 450 KD. Es besteht aus 2 ähnlichen Ketten mit Molekulargewichten von 230 KD und 220 KD, die an ihren COOH-Enden durch Disulfidbrücken verbunden sind. Fibronectin vermittelt durch seine Affinität das Anheften von Zellen an Zelloberflächen und an verschiedenen Substanzen wie Fibrin(ogen) und Kollagen (27,112,113). Die Molekularbereiche, an denen Fibrinogen und Kollagen gebunden werden, sind bekannt und eng benachbart (28). Die Affinität von Fibronectin zu Fibrinogen ist schwächer als die von Fibronectin zu Fibrin (65). Lösliches Fibronectin ist ein wichtiges Opsonin und ist für die Ausschleusung von löslichem Fibrin aus dem Blutkreislauf durch das retikuloendotheliale System wichtig. Fibronectin ist ein wichtiges Oberflächenprotein und ein wichtiger Bestandteil des Interstitiums (72,91).

3. MATERIAL UND METHODEN

Bei 26 rechtsmedizinischen Autopsien wurde nach Eröffnung des Pericards Pericardflüssigkeit und nach Durchtrennung der Vena cava inferior Leichenblut aus dem rechten Vorhof entnommen. Zum Ausschluß artifizierter Gerinnungs- oder Fibrinolyseprozesse wurde das Material unmittelbar bei der Entnahme mit einem Antikoagulans (0,13 mol tri-Na-citrat-2-hydrat, 0,06 mol TES, 0,05 mol EDTA, 1000 KIE/ml Aprotinin, pH 7,4) 1:10 versetzt, zentrifugiert und das Plasma bei -80°C eingefroren. Das Intervall zwischen dem Todeszeitpunkt und der Materialentnahme (postmortale Liegedauer), das erreichte Lebensalter, die Todesursache und die bei den Obduktionen beobachtete Blutkonsistenz sind in Tab. 1 angegeben.

Leiche Nr.	p.m. Liege- dauer	Lebens- alter	Todesursache	Blut- konsistenz
01	5h	43	Verbluten nach Messerstich	flüssig
02/H	8h	48	akuter Hirndruck	locker geronnen
03/H	12h	3/4	SIDS	flüssig
04	13h	79	zentrale Lähmung	flüssig
05/H	14h	29	Zyankali-Vergiftung	locker geronnen
06	15h	69	zentrale Lähmung bei Schädelbruch	locker geronnen
07	15h	42	Subarachnoidalblutung	flüssig
08/H	21h	21	innere Verblutung	flüssig
09	21h	56	zentrale Lähmung bei atypischem Erhängen	flüssig
10	26h	58	Ersticken (Blutaspiration)	flüssig
11	27h	84	Ersticken	locker geronnen
12/H	39h	19	traumatischer Schock bei Polytrauma	stark geronnen
13/H	40h	43	hämorrhagische Pneumonie	locker geronnen
14/H	41h	45	E 605-Vergiftung	flüssig
15	47h	3	Kälteschock	flüssig
16/H	50h	47	Diabetesentgleisung	locker geronnen
17	50h	34	zentrale Lähmung bei Hirntumor	locker geronnen
18/H	52h	37	Schädeldurchschuß	stark geronnen
19/H	54h	78	Diabetesentgleisung	locker geronnen
20	54h	57	Pneumonie	stark geronnen
21	59h	3	Ertrinken	flüssig
22/H	59h	63	Barbiturat-Vergiftung	flüssig
23/H	64h	44	CO-Vergiftung	flüssig
24	65h	26	Abriß Medulla Oblongata	flüssig
25/H	85h	54	Lungenembolie	locker geronnen
26	93h	51	cerebrale Massenblutung	locker geronnen

Tab. 1: Postmortale Liegedauer, Lebensalter, Todesursache und Blutkonsistenz der untersuchten Obduktionsfälle

3.1. Gerinnbares Protein

Das gerinnbare Protein wurde in Anlehnung an Blombäck in einer Modifikation von Hafter und Graeff durch Überführung mit Thrombin in ein Gerinnsel bestimmt (48). Es wurden jeweils 0,5 ml Plasma bzw. Herzbeutelflüssigkeit mit 0,1 ml Aprotinin (1000 KIE Trasylol), 0,1 ml Kalziumchlorid (0,025 M/l), 0,2 ml 0,9% Natriumchlorid und 0,1 ml Topostasin^R (60 IE Thrombin) versetzt. Das entstandene Gerinnsel wurde ausgepreßt, zwei mal in 0,9% NaCl gewaschen und in 5 ml einer alkalischen (5 M Harnstoff, 0,2 N NaCl) Harnstofflösung gelöst.

Anschließend wurde die Extinktion bei 280 nm und 325 nm im Beckman Spectralphotometer Mod. 35 in 1 cm Quarzküvetten gemessen, die unspezifische Extinktion (325 nm) subtrahiert und durch Multiplikation mit dem Faktor 6,918 die Menge an gerinnbarem Protein errechnet. Mit dieser Methode werden alle gerinnbaren Proteine, also neben dem Fibrinogen auch geringfügig abgebautes Fibrinogen, sowie der überwiegende Anteil des frühen Fibrinogenabbauproduktes X erfaßt (64). Die im Rahmen dieser Methode gewonnenen Serumproben wurden für die F-CB3 Bestimmungen sowie für den Staphylokokken-Clumping-Test aufbewahrt.

3.2. Fibrinopeptid A (FPA)

Das Fibrinopeptid A wurde nach einem von Nossel entwickelten RIA bestimmt (94,95), wobei das Serum durch Adsorption des Fibrinogens an Bentonit gewonnen wurde (RIA der Fa. Byk-Mallinckrodt). Die Werte von gesunden Probanden lagen damit bei uns unter 5 ng/ml.

Testprinzip: Die Analysenprobe, eine bekannte Menge Tracer (mit J^{125} -markiertes FPA) und Antikörpermoleküle gegen FPA werden gemeinsam inkubiert, so daß das FPA in der Probe und der Tracer um die konstante und begrenzte Anzahl der Bindungsstellen an den Antikörpern konkurrieren. Die Konzentration der Reaktionskomponenten im Testansatz ist dabei so gewählt, daß um so mehr Tracer gebunden wird, je weniger FPA in der Probe vorhanden ist. Zur Trennung des freien Tracers von der Antikörper-gebundenen Form wird eine 2. Antikörper- Polyäthylenglycollösung angewendet. Dieser 2. Antikörper ist gegen den ersten Antikörper des Antikörper-Tracer-Komplexes gerichtet. Es kommt zur Bildung eines leicht sedimentierbaren Komplexes. Die Radioaktivität dieses Komplexes wird mittels eines τ -Szintillationszählers bestimmt und die FPA-

Konzentration im Plasma über eine Eichkurve ermittelt.

Diese Eichkurve wird aus den 7 mitgelieferten Standards mit bekannten FPA-Konzentrationen erstellt.

3.3. F-CB3

(Frühes α -Kettenbruchstück F-CB3 verwandtes Antigen)

Das F-CB3 verwandte Antigen wurde mit Hilfe eines RIA bestimmt (43,45). Die Markierung des Antikörpers erfolgt mittels der Laktat Peroxydase Methode. Die Aktivität wird mit einem computerunterstützten Scanner der Fa. LKB gemessen und die Werte mit einer "spline function" berechnet. Die Normalwerte im Serum liegen unter 20 pM/l.

3.4. Staphylokokken-Clumping-Test

Staphylokokken des Stammes *Staphylococcus aureus* Newman D2C besitzen an ihrer Zelloberfläche einen sogenannten Clumpingfaktor. Die Zugabe des Staphylokokkenstammes zu Serum, das Fibrinogen oder die Fibrin(ogen)- Spaltprodukte X oder Y enthält, führt zu einer makroskopisch sichtbaren Verklumpung der Staphylokokken (58,59).

Wir benutzten den SCT-Combipack von Behring, wobei wir das bei der Bestimmung des gerinnbaren Proteins entstandene Serum verwendeten. Zunächst wird das Serum mit einer Tris-Pufferlösung in einer geometrischen Reihe verdünnt. Eine aufgeschüttelte Staphylokokken-suspension wird mit dem Serum vermischt und nach 2 Minuten der höchste Titer abgelesen, bei dem noch eine Verklumpungsreaktion eintritt. Berücksichtigt werden muß die 1:2 Verdünnung des Serums bei der vorangegangenen Fibrinogenbestimmung. Multipliziert man diesen berichtigten Titer mit der Nachweisgrenze von 0,6 µg/ml, so erhält man die FSP-Konzentration in µg/ml (76).

3.5. DD

DD wurde mit Hilfe eines ELISA unter Verwendung von monoclonalen Antikörpern von MabCo, Springwood (Australien) bestimmt (53).

3.6. Laser-Nephelometrie

Bei der Laser-Nephelometrie wird das Prinzip der Antigen-Antikörperkomplexbildung ausgenützt. Die Probe (Ag) wird mit einem Antikörper (Ak) in einer Küvette gemischt, so daß sich Ag-Ak-Komplexe bilden. Aus der Intensität der Streuung eines Laserstrahls an den Ag-Ak-Komplexen kann mit Hilfe einer Standardkurve die Ag-Konzentration in der Probe ermittelt werden. Da zu diesen Bestimmungen ein möglichst klares Plasma verwendet werden muß, werden die jeweiligen Proben zunächst mit dem Klärungsmittel Lipoclean^R (Behringwerke) behandelt. Als Verdünnungsmedium wird sterile, isotone NaCl-Lösung verwendet.

Voraussetzung für reproduzierbare Werte ist, daß Ag und Ak in einem solchen Verhältnis gemischt werden, daß man sich immer im ansteigenden Schenkel einer Heidelberger Kurve, also im Bereich eines geringen Ak-Überschusses befindet. Zur Bestimmung werden das Laser-Nephelometer, Antiseren und Standardplasma der Behringwerke verwendet. Die Auswertung erfolgt über den Tischrechner HP 97S der Fa. Hewlett-Packard, der über ein Interface mit dem Nephelometer verbunden ist.

Folgende Proteine wurden mit der Lasernephelometrie bestimmt: Prothrombin, Plasminogen, Antithrombin III und Fibronektin (120).

3.7. AT III funktionell

Da mit der Laser-Nephelometrie das AT III-Molekül nur immunologisch gemessen wird und somit keine Aussage über seine Funktion gemacht werden kann, bestimmten wir die funktionelle Aktivität des AT III. Da bei gesunden Normalpersonen bei beiden Bestimmungsmethoden sich gleiche Werte ergeben, kann aus einer Differenz zwischen funktionell und immunologisch gemessenem AT III auf einen Aktivitätsverlust des Moleküls geschlossen werden.

Zur Bestimmung benutzten wir den Test-Kit von Boehringer Mannheim. Er beruht auf dem Prinzip der Bestimmung eines chromogenen Substrates als Zweipunktmessung bei 37°C.

Zunächst wird AT III durch Heparin aktiviert:

$\text{AT III} + \text{Heparin} \rightarrow (\text{AT III} \cdot \text{Heparin})$

Thrombin, das an den AT III-Heparin-Komplex bindet, wird im Überschuß zugegeben:

$(\text{AT III} \cdot \text{Heparin}) + \text{Thrombin}_{\text{Überschuß}} \rightarrow$

$(\text{AT III} \cdot \text{Heparin} \cdot \text{Thrombin}) + \text{Thrombin}_{\text{Rest}}$

Der Thrombinrest wird nach einer gewissen Inkubationszeit mit Hilfe eines chromogenen Substrates bestimmt:

$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-pNa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Thrombinrest}}$

$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH} + \text{p-Na}$

Zum Abstoppen dieser Reaktion wird 20% Essigsäure verwendet. Die Extinktion wird bei 405 nm im Spectrophotometer Mod.35 der Fa. Beckman gemessen.

Der Normalbereich liegt bei 80% - 120% oder bei 20 - 29 IU/ml bei 37°C. Zur Qualitätskontrolle werden die Kontrollseren PreciChrom I bzw. PreciChrom II der Fa. Boehringer Mannheim mitbestimmt.

Anstelle des geforderten Citratplasmas wird das mit unserer Antikoagulantienlösung versetzte Material verwendet, da zahlreiche Vorversuche übereinstimmende Ergebnisse zeigten.

3.8. Elastase

Zur Bestimmung der Elastase wurde der Test-Kit von Merck verwendet. Hierbei kommt das immunologische Verfahren eines ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) zur Anwendung. Bestimmt wird die PMN-Elastase aus polymorphnukleären Leukozyten, die im Plasma im Komplex mit dem α_1 -Proteinase-Inhibitor vorliegt. Verwendet werden dazu Polystyrol-Röhrchen, die mit Antikörper vom Schaf gegen humane Granulozyten-Elastase beschichtet sind. Von diesen Antikörpern wird der in der Probe vorhandene Komplex mit seinem PMN-Elastase-Teil gebunden. Durch Abgießen des Überstandes und Waschen der Kunststoffröhrchen mit einer speziellen Waschlösung werden die übrigen Probenanteile nach einer bestimmten Inkubationszeit abgetrennt. Danach werden enzymmarkierte spezifische Antikörper gegen α_1 -Proteinase-Inhibitor zugegeben. Sie binden an die antigenen Determinanten des α_1 -Proteinase-Inhibitors

im Komplex am Röhrchen. Markierungsenzym ist die alkalische Phosphatase. Nach Auswaschen der überschüssigen enzymmarkierten Antikörper bestimmt man die enzymatische Aktivität des Antikörper-Enzym-Konjugates am Röhrchen. Substrat hierbei ist 4-Nitrophenylphosphat. Durch Zusatz von Natronlauge (2 mol/l) wird die Hydrolyse des Substrates unterbrochen. Die Farbintensität des Reaktionsgemisches wird bei 405 nm im Photometer bestimmt. Sie ist der Konzentration des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitors in der Probe proportional. Die PMN-Elastase-Konzentration wird aus einer mit Hilfe von Standards erstellten Eichkurve ermittelt.

Zur Qualitätskontrolle wird das der Testpackung beigefügte Kontrollplasma verwendet. Das zur Messung benutzte Plasma ist mit unserer Antikoagulantienlösung versetzt (99).

3.9. pH

Die Bestimmung des pH wird mit Spezialindikatorpapier Art.9557 der Fa. Merck durchgeführt. Dies geschieht sowohl vor als auch nach Zugabe des Antikoagulans.

3.10. Statistische Auswertung

Es werden die Mittelwerte und die einfachen Standardabweichungen berechnet.

Der statistische Vergleich der FSP-Werte im flüssigen und geronnenen Leichenplasma erfolgt mit dem t-Test nach Student.

3.11. Immunadsorption

Fibrinogen- und Fibronektin-Antikörper (Fa. Behring) werden gemäß Firmenvorschrift kovalent an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Zur Koppelung werden folgende Lösungen benötigt:

Waschlösung : 1mM HCl (200 ml/g).

Koppelpuffer : 0,1 M NaHCO₃ mit 0,5 M NaCl (pH 8,3)

zum Abblocken: 0,2 M Glycin (pH 8,0)

Acetatpuffer : 0,1 M Essigsäure, 0,1 M Natriumacetat
(pH 4)

Die gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose 4B wird zunächst mit 1mM HCl aufgeschwemmt. Danach wird dem Fibrinogen-Antikörper Koppelpuffer zugesetzt und somit an die Sepharose gekoppelt. Noch freie aktive Gruppen der Sepharose werden mit Glycin besetzt. 5-maliges abwechselndes Waschen mit Koppelpuffer (pH 8,3) und Acetatpuffer (pH 4) entfernt die nicht gebundenen Proteine. Das so erhaltene Gel wird in folgendem Puffer aufbewahrt: 0,02 M Natriumphosphatpuffer, 0,65 M NaCl, 0,02% Natriumacid.

0,5 ml Plasma werden mit 5 ml 0,9% NaCl und 0,5 ml Sepharose-Antikörper-Gel versetzt und 30 min Kopf-über rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,9% NaCl wird das an den Sepharose-Antikörper gebundene Fibrinogen bzw. Fibronektin-Material mit 0,4 ml 2% SDS-Lösung in 8 M Harnstoff aus der Antigen-Antikörper Bindung freigesetzt.

Ein Teil der Proben wird zur reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken mit Mercaptoäthanol versetzt.

3.12. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur weiteren analytischen Charakterisierung der gefällten Fibrinderivate werden SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresen nach Weber und Osborn (130) durchgeführt. Entsprechend der von Furthmayr und Timpl (39) modifizierten Methode von Shapiro et al. (116) werden 7,5% (reduzierte Proben) und 4% Gele mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 und 0,1% SDS zur Trennung verwendet.

3.12.1. Elektrophoresen-Ansatz

Lösung A (Gelansatz) für 4% Gele: In 50 ml Phosphatpuffer pH 7,2 werden 8 g Acrylamid und 0,31 g DATD und 0,2 g SDS gelöst, 0,2 ml TEMED (N,N,N,N-tetra-methylethylendiamin) zugegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml verdünnt.

Für 7,5% Gele werden in 50 ml Phosphatpuffer pH 7,2 15 g Acrylamid und 400 mg Methylenbisacrylamid sowie 0,2 g SDS und 0,2 ml TEMED gelöst und mit Aqua dest. auf 100 ml verdünnt.

Lösung B (Polymerisator): In 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 werden 150 mg Ammoniumpersulfat gelöst.

Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt, sofort in Glasröhrchen (6x100 mm) überführt, mit 70% Isopropanol überschichtet und mehrere Stunden bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren aufbewahrt. Die elektrophoretische Trennung wird mit 5 mA/Gel über 10 bis 12 Stunden durchgeführt. Als Laufpuffer wird ein 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 verwendet (51).

3.12.2. Färben der Gele

Die Gele werden in dem Proteinfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 für ca. 5h gefärbt. Der Lösungsansatz besteht aus 0,4 g Coomassie Blue G-250 gelöst in einer Mischung (1:1) von je 250 ml Methanol und 7% Essigsäure (13).

Die Entfärbung der Gele erfolgt in 7% Essigsäure.

3.12.3. Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgt mit dem Laserdensitometer der Fa. LKB.

3.12.4. Molekulargewichtsbestimmung unbekannter Proteine

Da homologe Proteine im elektrischen Feld in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) proportional zu ihrem Molekulargewicht wandern, ergibt sich bei halblogarithmischer Auftragung eine lineare Abhängigkeit zwischen der in der Elektrophorese zurückgelegten Wanderungsstrecke und dem Molekulargewicht. Verwendet man daher in den Densitometerkurven der elektrophoretischen Auftrennungen die in der Elektrophorese zurückgelegten Wegstrecken der bekannten Fibrin(ogen)derivate Y, DD, DY und Fibrinogen und ihre bekannten Molekulargewichte als Eichwerte, so kann man die Schnittpunkte durch eine Gerade verbinden. Aus den Schnittpunkten der Wanderungsstrecke der zu bestimmenden unbekannten Derivate mit dieser Geraden können deren Molekulargewichte ermittelt werden (51,52).

3.13. In vitro Simulation

Bei der in vitro Simulation postmortaler Gerinnungs- und Fibrin(ogen)olysevorgänge wird jeweils zu 1 ml einer Lösung mit 20 mg Fibrinogen / ml (Behringwerke), 3 ml Pufferlösung, 2 ml Calciumchlorid (0,025 M) und in zeitlich unterschiedlicher Folge 3 IU Thrombin (Topostasin^R) und 100 Einheiten Streptokinase (Teststreptokinase Behringwerke) zugegeben. Das Gemisch wird bei 37°C inkubiert. Ein sich bildendes Gerinnsel löst sich je nach Ansatz unterschiedlich schnell, ganz oder teilweise, wieder auf. Die Reaktionen werden anschließend mit 0,5 ml Trasylol^R (5000 KIU Aprotinin) gestoppt.

Die zeitlichen Abstände der Zugabe von Thrombin (T) und Streptokinase (Sk) werden folgendermaßen variiert:

Ansatz 1: T 60 sec. nach Sk bei a:pH 7,4 b:pH 6,5

Ansatz 2: T gleichzeitig mit Sk bei a:pH 7,4 b:pH 6,5

Ansatz 3: T 100 sec. vor Sk bei a:pH 7,4 b:pH 6,5

Ansatz 4: T 200 sec. vor Sk bei a:pH 7,4 b:pH 6,5

4. ERGEBNISSE:

Bei den 26 durchgeführten rechtsmedizinischen Autopsien fanden sich große Unterschiede in Bezug auf die postmortale Liegedauer, den Todeszeitpunkt, die Todesursache und die Blutkonsistenz. Flüssiges und geronnenes Leichenblut wurde je 13 mal beobachtet. Zwischen Blutkonsistenz und postmortaler Liegedauer ließ sich kein Zusammenhang erkennen (Tab.1).

4.1. Gerinnbares Protein

Fibrinogen konnte in keinem einzigen Leichenplasma nachgewiesen werden. In der Herzbeutelflüssigkeit fanden sich dagegen niedrigere Konzentrationen ($33,2 \pm 22,3$ mg/dl) (Tab. 2).

4.2. Fibrinopeptid A (FPA)

Die FPA-Werte lagen im Leichenplasma ausnahmslos über 1000 ng/dl, einige bis über 30.000 ng/ml, während sie in der Herzbeutelflüssigkeit nur auf 162 ± 108 ng/ml erhöht waren (Tab.2).

4.3. F-CB3

Die F-CB3-Werte waren im Leichenplasma auf 2517 ± 1271 pmol/ml erhöht. Zwischen geronnenem und flüssigem Leichenplasma bestand kein wesentlicher Unterschied. Der Wert in der Herzbeutelflüssigkeit betrug 585 ± 421 pmol/ml (Tab.2).

4.4. Fibrinogen-Spaltprodukte (FSP)

Die FSP-Werte waren im flüssigen Leichenplasma mit 517 ± 956 µg/ml höher als im geronnenen Leichenplasma mit 96 ± 66 µg/ml. In 3 der flüssigen Leichenplasmen wurden extrem hohe FSP- Werte mit bis zu 3584 µg/ml gefunden. Aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte in beiden Gruppen war der gefundene Unterschied jedoch nicht signifikant ($p < 0,5$). Die FSP-Werte in der Herzbeutel-flüssigkeit betrugen 42 ± 37 µg/ml (Tab.2).

4.5.DD

Die DD-Werte waren sowohl im flüssigen (429 ± 189 $\mu\text{g/ml}$) als auch im geronnenen (555 ± 200 $\mu\text{g/ml}$) Leichenplasma deutlich erhöht. Die DD-Werte in der Herzbeutelflüssigkeit betrugen 164 ± 77 $\mu\text{g/ml}$ (Tab.2).

4.6. AT III und Laser-Nephelometrie

Die Konzentrationen von AT III, Prothrombin und Plasminogen lagen im geronnenen Leichenplasma geringfügig niedriger als im flüssigen Leichenplasma, während die AT III- Konzentration in allen Flüssigkeiten im Normalbereich war. In allen Proben ist die AT III- Aktivität um etwa 20% niedriger als die AT III- Konzentration.

Die Fibronektin-Werte im flüssigen Leichenplasma ($31,5 \pm 21,5$ mg/dl) waren etwas höher als die im geronnenen Leichenplasma ($22,3 \pm 16,6$ mg/dl). In der Herzbeutelflüssigkeit wurden $8,0 \pm 4,1$ mg/dl gefunden (Tab.2)

	Leichenplasma			Herzbeutel- flüssigkeit
	total n = 26	flüssig n = 13	geronnen n = 13	n = 13
Fibrinogen (200-400mg/dl)	< 10	< 10	< 10	33,2 ± 22,3
Fibrinopeptid A (FPA) (< 8ng/ml)	> 1000	> 1000	> 1000	162 ± 108
F-CB 3 (< 20pmol/ml)	2517 ± 1271	2613 ± 1255	2445 ± 1364	585 ± 421
FDP (2,5-5,0µg/ml)	307 ± 698	517 ± 956	96 ± 66	42 ± 37
DD (< 0,3µg/ml)	488 ± 199	429 ± 189	555 ± 200	164 ± 77
Antithrombin III Aktivitat (80%-120%)	77% ± 28%	86% ± 27%	69% ± 27%	76% ± 28%
Antithrombin III Konz. (80%-120%)	104% ± 28%	109% ± 22%	99% ± 32%	96% ± 19%
Prothrombin Konz. (5-10 mg/dl)	10,8 ± 8,9	11,5 ± 10,4	9,9 ± 7,2	7,2 ± 2,3
Plasminogen Konz. (6-25 mg/dl)	7,5 ± 4,9	8,3 ± 6,1	7,4 ± 3,6	5,8 ± 1,7
Fibronektin (25-40 mg/dl)	26,9 ± 19,4	31,5 ± 21,5	22,3 ± 16,6	8,0 ± 4,1

Tab. 2: Fibrinogen, FPA, F-CB3, FDP, DD, AT III, Prothrombin, Plasminogen, Fibronektin in flüssigen und geronnenen Leichenplasma und in der Herzbeutel-flüssigkeit. Die Normalwerte sind in () angegeben.

4.7. Elastase

Leichenplasma			Herzbeutel- flüssigkeit
total n = 14	flüssig n = 8	geronnen n = 6	n = 8
3081 ± 1432	2915 ± 1288	3348 ± 1760	1330 ± 1125

Tab. 3: PMN-Elastase-Inhibitorkomplex in Leichenplasma und Herzbeutelflüssigkeit (Normalwert 58-115 µg/l)

Die Elastase-Werte betrugen im flüssigen Leichenplasma 2915 ± 1288 µg/ml, im geronnenen Leichenplasma 3348 ± 1760 µg/ml und in der Herzbeutelflüssigkeit 1330 ± 1125 µg/ml (Tab.3). Es besteht eine gute Korrelation ($r=0,896$) zwischen der postmortalen Liegedauer und der Höhe der Elastase-Werte im Leichenplasma (Abb.2).

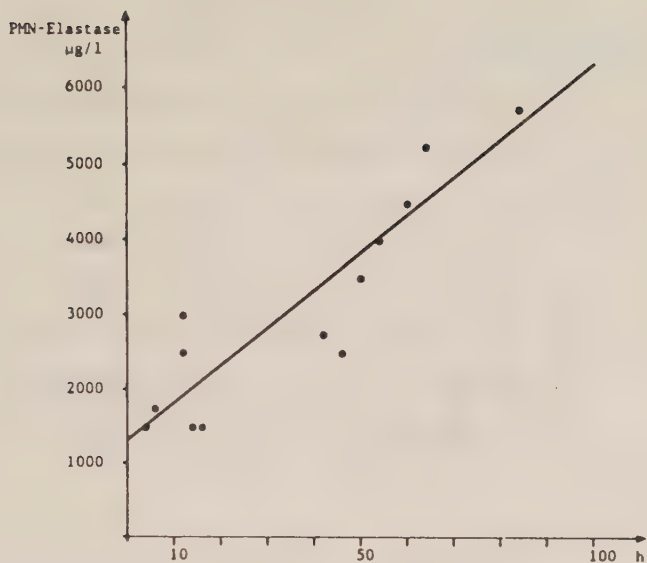


Abb. 2: Korrelation zwischen der postmortalen Liegedauer und den Elastasewerten im Leichenplasma ($r = 0,896$).

4.8. pH

Im Leichenplasma wurden pH-Werte zwischen 6 und 7 gemessen.

4.9. Elektrophoresen

4.9.1. Fibronektin-Material

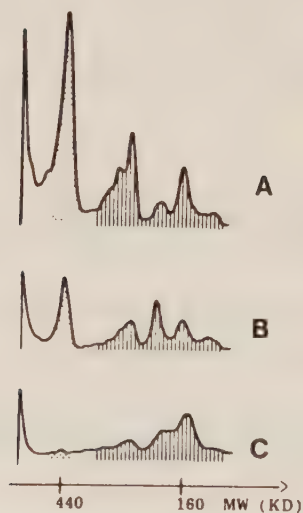


Abb. 3: Scans von Fibronektinmaterial, das auf 4% SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Die Liegedauer der Leichen betrug A: 13 h, B: 40 h und C: 64 h. Punktlierter Bereich: nicht abgebautes Fibronektin
Schrafflierter Bereich: Fibronektin-Abbauprodukte

Die Elektrophoresen des Fibronektin-Materials zeigen einen mit der postmortalen Liegedauer zunehmenden Abbau des Plasma-Fibronektins. Fibronektin-Abbauprodukte mit den Molekulargewichten von 300 kd bis 120 kd ließen sich nachweisen (Abb.3). Der relative Anteil der Fibronektin- Spaltprodukte nimmt, bezogen auf das intakte Fibronektin (440 kd), kontinuierlich zu. Intaktes Fibronektin ist schließlich im Leichenplasma mit langer postmortaler Liegedauer praktisch nicht mehr nachweisbar. Die Fibronektin-Werte (gemessen mit dem Laser-Nephelometer) nehmen aber nicht ab.

4.9.2. Fibrin(ogen)-Material

Die Elektrophoresen des aus dem Leichenplasma und der Herzbeutelflüssigkeit isolierten Fibrin(ogen)-Materials sind in den Abbildungen 4 bis 6 wiedergegeben. Mit Hilfe der Molekulargewichtsbestimmung konnten folgende Banden identifiziert werden: Fibrinogen (340 kd), leicht abgebautes Fibrinogen (300 kd), die Fibrinogenabbauprodukte prae-X (280 kd), X (240 kd), Y (155 kd) und D (95 kd), sowie die Fibrinabbauprodukte DXY (485 kd), DXD (440 kd), XY (400 kd), DX (340 kd), YY (290 kd), DY (240 kd) und DD (185 kd).

In dem reduzierten Material konnten neben den vorwiegend im Leichenplasma auftretenden dimeren τ -Ketten ($\tau\tau$, $\tau^1\tau$, $\tau^1\tau^1$) die Ketten bzw. Kettenfragmente β (56 kd), β^1 (53 kd), β^2 (44 kd) und τ (49 kd) nachgewiesen werden.

4.9.2.1. Fibrin(ogen)-Material aus geronnenem Leichenblut

Eine typische elektrophoretische Auftrennung von Fibrin(ogen)-Material aus geronnenem Leichenblut ist in Abb.4A wiedergegeben. Es dominieren die Banden DY (210 kd) und DD (185 kd). In geringeren Mengen findet sich Y (155 kd) und D (95 kd). Fibrinogen läßt sich nicht sicher nachweisen. Möglicherweise verbergen sich geringe Fibrinogenanteile im Bandenbereich mit dem MG 340-300 kd. Im hochmolekularen Bereich ($MG > 340$ kd) werden die Banden DXD (440 kd), XY (400 kd) und DX (340 kd) nachgewiesen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fibrin(ogen)-Ketten-Untereinheiten zeigt einen hohen Anteil quervernetzter τ -Ketten. Intakte α -Ketten können nicht sicher nachgewiesen werden (Abb.5A).

4.9.2.2. Fibrin(ogen)-Material aus flüssigem

Leichenblut

Eine typische elektrophoretische Auftrennung von Fibrin(ogen)-Material aus flüssigem Leichenblut ist in Abb.4B wiedergegeben. Das Bandenmuster der Elektrophoresen ist mit dem aus dem geronnenem Leichenplasma identisch. Der relative Anteil jeder Bande am gesamten aufgetrennten Material wird durch die Fläche unter dem jeweiligen Scanpeak wiedergegeben. Vergleicht man die Fläche für die Fibrinogenabbauprodukte (schwarz) mit dem Anteil der Fibrinabbauprodukte (punktiert), so zeigt sich, daß der relative Anteil der Fibrinogenabbauprodukte (schwarz), insbesondere von Y, im flüssigen Leichenplasma (Abb.4B) größer ist als im geronnenem Leichenplasma (Abb.4A).

4.9.2.3. Fibrin(ogen)-Material aus Herzbeutelflüssigkeit

Im Gegensatz zu den elektrophoretischen Auftrennungen aus dem Leichenplasma wurde in der Herzbeutelflüssigkeit vorwiegend intaktes (340 kd) und leicht abgebautes (300 kd) Fibrinogen gefunden. Daneben konnten geringe Mengen der Abbauprodukte X/DY, DD, Y und D nachgewiesen werden (Abb.4C).

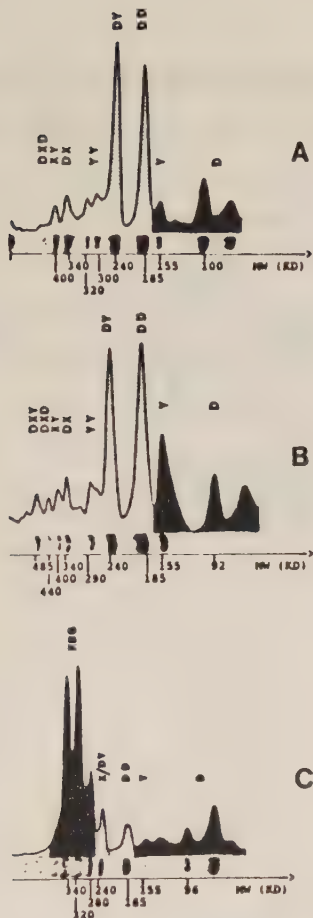


Abb. 4: 4% SDS-PAGE mit Scan von Fibrin(ogen)-Material aus A: geronnenem und B: flüssigem Leichenblut sowie C: Herzbeutel Flüssigkeit. Die punktierte Fläche entspricht Fibrin-Material, die schwarze Fläche Fibrinogen-Material.

4.9.2.4. Reduziertes Fibrin(ogen)-Material

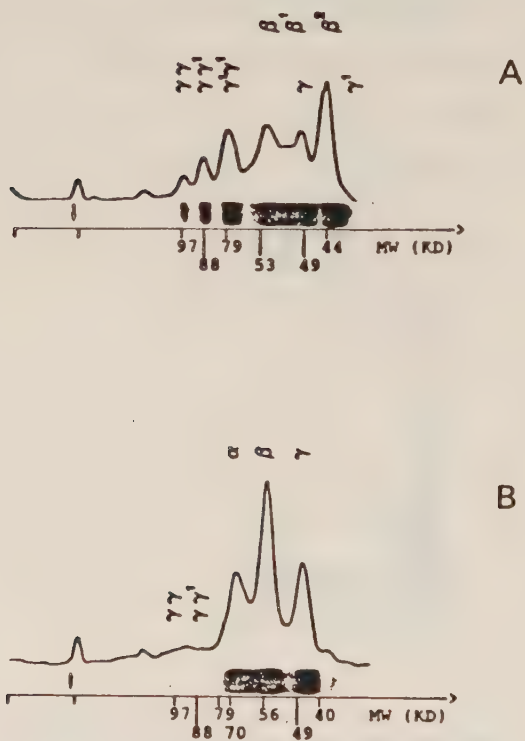


Abb. 5: 7,5% SDS-PAGE mit Scan von reduziertem Fibrin(ogen)-Material aus
A: geronnenem Leichenblut und
B: Herzbeutelflüssigkeit.

In Übereinstimmung mit dem hohen Anteil an Fibrin-Material im Leichenplasma ließen sich bei der Auftrennung der Fibrin(ogen)-Ketten-Untereinheiten im reduzierten Material hohe Anteile dimerer τ -Ketten ($\tau\tau$, $\tau\tau^1$, $\tau^1\tau^1$) nachweisen (Abb.5A). Im Herzbeutel fanden sich dagegen neben den intakten α , β und τ -Ketten nur sehr geringe Mengen dimerer τ -Ketten (Abb.5B).

4.9.2.5. In vitro Simulation

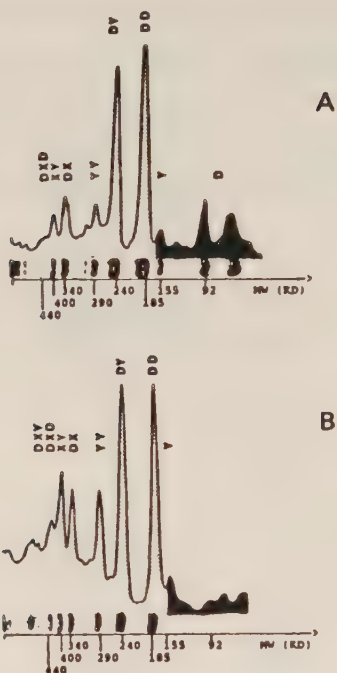


Abb. 6: 4% SDS-PAGE mit Scan von Fibrin(ogen)-Material aus A: geronnenem Leichenplasma sowie B: in vitro Ansatz 3b (Zugabe von Thrombin 100 s vor Streptokinase, pH 6,5) Die punktierte Fläche entspricht Fibrin-, die schwarze Fläche Fibrinogen-Material.

Die elektrophoretischen Auftrennungen des Fibrinogen-Materials aus den in-vitro Ansätzen waren denen aus dem Leichenplasma sehr ähnlich. Die Banden DY und DD dominierten. Ebenso wurde ein charakteristisches Bandenmuster hochmolekularer Fibrinderivate gefunden (Abb.6A+B).

Die in vitro Ansätze zeigten in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der zeitlichen Zugabe von Thrombin bzw. Streptokinase eine unterschiedlich schnelle Bildung und Wiederauflösung des Fibringerinnsels. Nach Zugabe von Thrombin wurde bei einem pH-Wert von 7 nach 80 bis 100 sec eine Gerinnselbildung beobachtet, bei einem pH-Wert von 6 bereits nach 40 sec. Erfolgte die Zugabe von Streptokinase vor Zugabe von Thrombin, oder kurz danach, so wurde die Bildung eines locker-gallertigen Gerinnsels beobachtet, das sich nach ca 7 bis 10 Minuten vollständig wiederauflöste. Erfolgte die Zugabe von Streptokinase nach einer thrombininduzierten Gerinnselbildung, so kommt es zur Bildung eines stabileren Gerinnsels, das sich erst nach Stunden und nur teilweise wieder auflöste.



Abb. 7: 4% SDS-PAGE mit Scan von Fibrin(ogen)-Material aus in vitro Versuchen (pH 6,5). Zugabe von Thrombin: A: 60 s nach B: simultan mit und C: 200 s vor Streptokinase
Die punktierte Fläche entspricht Fibrin-, die schwarze Fläche Fibrinogen-Material.

Abhängig vom Intervall zwischen der Zugabe von Thrombin und Streptokinase ließen sich in den in vitro-Ansätzen unterschiedliche große Anteile an Fibrin- und Fibrinogen- Abbauprodukten nachweisen. Je früher die Zugabe von Streptokinase bezogen auf die Zugabe von Thrombin zu der Fibrinogenlösung erfolgte, desto deutlicher war der Anteil an Fibrinogenolyseprodukten, insbesondere Y. Diese elektrophoretischen Auftrennungen zeigten eine große Ähnlichkeit mit den Auftrennungen aus flüssigem Leichenplasma. Je später die Zugabe von Streptokinase erfolgte, desto mehr nahm der Anteil der Fibrinogenolyseprodukte und der hochmolekularen Fibrinabbauprodukte ab. Überwiegend wurde das Endabbauprodukt DD beobachtet (Abb.7A-C).

5. DISKUSSION:

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (57,67,114) kann Fibrinogen im Leichenplasma nicht nachgewiesen werden (Tab.2). Das belegt eine vollständige Defibrinogenierung des Leichenplasmas. Dabei weisen die gleichzeitig gemessenen hohen FPA-Spiegel (Tab.2) auf eine intensive thrombininduzierte postmortale Gerinnung, und die hohen F-CB3-, FSP- und DD-Werte (Tab.2) auf intensive postmortale Fibrin(ogen)olyse hin. Die F-CB3 und die FSP-Werte erlauben keine Unterscheidung zwischen Fibrinogenolyse und Fibrinolyse. Die hohen DD-Werte belegen dagegen intensiv abgelaufene Fibrinolyse.

Die trotz der ausgeprägten postmortalen Koagulation und Fibrin(ogen)olyse normalen Konzentrationen von AT III, Prothrombin und Plasminogen können mit Eindickungsvorgängen im Leichenplasma (5,77) erklärt werden. Die Abweichung der gemessenen AT III-Konzentration von der AT III-Aktivität deutet auf eine limitierte Proteolyse des AT III im Rahmen der hohen proteolytischen Aktivität im Leichenplasma hin.

An der hohen fibrin(ogen)olytischen Aktivität im Leichenplasma kann die PMN-Elastase (Tab.3) aufgrund ihrer fibrin(ogen)olytischen Eigenschaften (98,106) einen wichtigen Anteil haben. Ein Einfluß der PMN-Elastase auf die unterschiedliche Konsistenz des Leichenplasmas kann jedoch nicht erkannt werden. Zwischen der PMN-Elastase-Konzentration und der postmortalen Liegedauer besteht aber eine gute Korrelation (Abb.2). Diese weist auf die postmortal zunehmende Alterung und Lyse von Granulozyten (77) hin.

Der zunehmende Abbau von Fibronektin im postmortalen Verlauf (Abb.1) zeigt zunehmende proteolytische Aktivität im Leichenplasma. Die Beobachtung, daß der in der Laser-Nephelometrie verwendete Antikörper auch eine Reihe von Spalt-Produkten des Fibronektins erfaßt (Abb.3), erklärt die teilweise sehr hohen Fibronektin-Werte. Die Untersuchungen zeigen, daß die mit dem Laser-Nephelometer gemessenen Fibronektin-Konzentrationen in Flüssigkeiten mit hoher proteolytischer Aktivität keinen unmittelbaren Rückschluß auf die Konzentration von nicht abgebautem Fibronektin (MW 440 kd) erlauben.

Zwischen dem Auftreten von flüssigem oder geronnenem Leichenplasma und der Intensität der abgelaufenen Gerinnungs- und Fibrin(ogen)olyseprozesse kann anhand der quantitativen Meßparameter kein Zusammenhang erkannt werden (Tab.2).

Der elektrophoretische Nachweis eines fast identischen Bandenmusters des Fibrin(ogen)-Materials aus dem flüssigen und dem geronnenen Leichenplasma weist darauf hin, daß qualitativ vergleichbare Gerinnungs- und Fibrinolyseprozesse zu flüssigem und geronnenem Leichenplasma führen. Das Überwiegen der Banden DY und DD und der fehlende Nachweis von Fibrinogen belegt, daß im flüssigen und geronnenen Leichenplasma fast das gesamte Fibrinogen quervernetzt und das gebildete Fibrin ganz oder teilweise wieder abgebaut wird. Die elektrophoretischen Befunde sind somit in guter Übereinstimmung mit den hohen FPA-, F-CB3-, FDP- und DD-Werten, wobei letztere direkt das in der DD-Bande isolierte Material quantitativ repräsentieren.

Unterschiede zwischen dem flüssigen und dem geronnenen Leichenplasma werden aber bei dem relativen Anteil der Fibrinogenabbauprodukte zu den Fibrinabbauprodukten gefunden. Während im geronnenen Leichenplasma nur sehr

geringe Anteile der Fibrinogenolyse-Abbauprodukte Y und D nachweisbar sind (Abb.4A - schwarze Fläche), werden im flüssigen Leichenplasma größere Anteile von Fibrinogen- Abbau-Produkten (Abb.4B - schwarze Fläche) gefunden. Im flüssigen Leichenplasma findet somit Fibrinogenolyse im größeren Umfang statt als im geronnenen Leichenplasma. Die Bedeutung dieser Beobachtung zeigen die in vitro Versuche.

Die große Ähnlichkeit der elektrophoretischen Befunde des Fibrin(ogen)-Materials aus den in vitro Versuchen und dem Leichenplasma (Abb.6A+B) zeigt, daß intensive Gerinnung und Fibrin(ogen)olyse postmortal nebeneinander ablaufen. Dafür spricht auch der Nachweis der hochmolekularen Fibrinabbauprodukte (49).

Darüber hinaus zeigen die in vitro Versuche (Abb.7), daß die zeitliche Relation der Aktivierung von Koagulation und Fibrin(ogen)olyse zueinander bezüglich der Entstehung von flüssigem oder geronnenem Leichenplasma von großer Bedeutung ist. Wird bei den in vitro Versuchen die Fibrin(ogen)olyse stimuliert, bevor die Bildung eines thrombininduzierten Gerinnsels eintritt, so bildet sich ein lockeres Gerinnsel, das sich

schnell und vollständig wieder auflöst. Die Elektrophoresen dieses Fibrin(ogen)-Materials zeigen, insbesondere im Bezug auf den Anteil des Fibrinogenolyseprodukts Y große Ähnlichkeit mit den Auftrennungen aus flüssigem Leichenplasma (Abb.7A+B). Je früher die Fibrinogenolyse einsetzt, desto größer ist der Fibrinogenanteil, der vor seiner Quervernetzung (zu Fibrin) zu Y und D abgebaut werden kann.

Wird jedoch die Fibrin(ogen)olyse erst nach der Bildung des Gerinnsels aktiviert, so erfolgte seine Wiederauflösung nur teilweise und verzögert. Der Anteil der Fibrinogenolyse-Abbauprodukte Y und D ist nur sehr gering (Abb.7C) und entspricht den Verhältnissen im geronnenen Leichenplasma.

Die Versuche zeigen, daß der Einschluß des Plasminogenaktivators in das sich bildende Gerinnsel dessen homogene, rasche und komplette Lyse bewirkt. Wird der Plasminogen-Aktivator erst nach erfolgter Gerinnselbildung zugesetzt, so muß er von außen in das Gerinnsel diffundieren und löst es schrittweise von der Oberfläche auf. Dabei entsteht vorwiegend das weit abgebaute Fibrinolyse-Endabbau-Produkt DD (49), während

der Anteil hochmolekularer Fibrinabbauprodukte abnimmt (Abb.7).

Die in vitro Versuche zeigen, daß für die Entstehung flüssigen Leichenplasmas eine gleichmäßige Verteilung der Fibrin(ogen)olyseaktivatoren vorteilhaft ist. Diese Voraussetzungen sind nur gegeben, wenn die Aktivierung der Fibrin(ogen)olyse vor oder gleichzeitig mit der Koagulation, also vor der Gerinnungsbildung erfolgt. Darüber hinaus wird eine Aktivierung der Fibrin(ogen)-olyse praefinal, bei noch vorhandener Zirkulation, zu einer günstigen Verteilung des Plasminogenaktivators führen. Große Unterschiede in der praefinalen Aktivierung der Koagulation und Fibrin(ogen)olyse konnten zu Beginn von Reanimationen nachgewiesen werden (73). Vermutlich ist deshalb bereits die praefinale Aktivierung der Gerinnung oder Fibrino(geno)lyse für die Konsistenz des Leichenplasmas von großer Bedeutung.

Somit können praefinale Faktoren, wie z.B. streßbedingte hohe Katecholaminspiegel, die zu einer beträchtlichen Freisetzung von Plasminogenaktivatoren aus den Gefäßendothelien führen (22,29,47,69,70,81) wesentlichen Einfluß auf die postmortale Konsistenz

des Blutes nehmen. Da die Koagulation bei normalem pH langsamer abläuft als bei erniedrigtem pH, wird ein normaler pH-Wert und eine noch vorhandene Zirkulation zum Zeitpunkt der Freisetzung der Fibrinolyseaktivatoren die Bildung flüssigen Leichenplasmas begünstigen. Das bevorzugte Auftreten von flüssigem Leichenplasma bei Todesursachen mit präfinalem Streß und kurzer Agoniedauer (1,57,88,92,123) ist mit diesen Befunden gut vereinbar.

Beim Tod mit langer Agoniedauer kommt es oft bereits praefinal zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Blutzirkulation und zu einem Abfall des pH-Wertes. Dadurch wird die Bildung stabiler Gerinnsel vor der Aktivierung der Fibrin(ogen)olyse begünstigt. Die Beobachtung von vorzugsweise geronnenem Leichenplasma bei langer Agoniedauer ist damit in gutem Einklang.

Der Nachweis von Fibrinogen in den Herzbeutelflüssigkeiten belegt wesentlich geringer abgelaufene Gerinnungs- und Fibrinolyseaktivität als im Leichenplasma. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den gemessenen FPA- und F-CB3-Werten sowie den elektrophoretischen Auftrennungen. Neben dem dominie-

renden Anteil an intaktem Fibrinogen können quervernetzte Fibrinabbauprodukte wie DD nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Entsprechend dem überwiegenden Anteil an Fibrinogen finden sich in den reduzierten Proben neben den aus dem Fibrinogen stammenden α , β und τ - Ketten nur andeutungsweise aus dem Fibrin stammende quervernetzte τ -Ketten. Da physiologischerweise die Freisetzung von Koagulations- und Fibrinolyseparametern aus den Gefäßendothelien erfolgt (8,9), lassen die in der Herzbeutelflüssigkeit in geringerem Ausmaß als im Leichenplasma abgelaufenen Hämostaseprozesse vermuten, daß für die intensiv ablaufenden Koagulations- und Fibrinolyseprozesse im Leichenplasma Aktivatoren verantwortlich sind, die prae- oder postmortal aus den Gefäßendothelien freigesetzt werden.

Somit können in Abhängigkeit von der zeitlichen Variation zwischen dem Einsetzen der Koagulation und der Fibrin(ogen)olyse sowie in Bezug auf den pH-Wert und die unmittelbar praefinale Kreislauftsituation alle Abstufungen zwischen flüssigem, locker geronnenem oder fest geronnenem Leichenplasma erklärt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zur Klärung der widersprüchlichen Theorien über postmortal ablaufende Vorgänge der Koagulation und Fibrin(ogen)olyse beizutragen, und eine Erklärung für die Entstehung von flüssigem oder geronnenem Leichenplasma zu finden.

Neben Fibrinogen wurden die Fibrin(ogen)-Abbauprodukte FPA, F-CB3, FDP, DD sowie AT-III, Prothrombin, Plasminogen, Fibronektin und Elastase gemessen. Elektrophoresen wurden zur Identifizierung der Abbauprodukte von Fibrin(ogen) und Fibronektin durchgeführt.

Mit Hilfe der Fibrin(ogen)-Abbauprodukte konnten intensive Gerinnungs- und Fibrin(ogen)olyse-Prozesse im Leichenplasma nachgewiesen werden. Zwischen flüssigem und geronnenem Leichenplasma wurden keine quantitativen Unterschiede gefunden. Die Elastase sowie ein zunehmender Anteil an Fibronektin-Abbauprodukten waren die einzigen Parameter, die eine Korrelation zur postmortalen Liegedauer zeigten.

Die elektrophoretischen Auftrennungen des Fibrin(ogen)-Materials aus dem Leichenplasma und aus in vitro Versuchen, in denen postmortal ablaufende Gerinnung und Fibrin(ogen)olyse simuliert wurde, zeigten, daß postmortal nebeneinander Gerinnung und Fibrin(ogen)olyse ablaufen. Der Nachweis der dominierenden Abbauprodukte DY und DD in den Elektrophoresen stand dabei in guter Übereinstimmung mit den hohen Werten der quantitativ gemessenen Fibrin(ogen)-Abbauprodukte.

Unterschiede bezüglich flüssigem und geronnenem Leichenplasma ergaben sich in den Elektrophoresen nur bezüglich des relativen Anteils der Fibrinogenolyse-Produkte, insbesondere des Y. Durch die zeitversetzte Zugabe von Streptokinase und Thrombin zu einer Fibrinogenlösung konnte gezeigt werden, daß der höhere Anteil der Fibrinogenolyse-Abbauprodukte im flüssigen Leichenplasma auf eine Stimulation der Fibrinogenolyse vor dem Eintreten einer thrombininduzierten Gerinnung zurückzuführen ist und die so entstandenen Gerinnung sich rasch und vollständig wieder

auflösen. Eine, in Bezug auf die Koagulation, früh einsetzende Fibrin(ogen)olyse wird deshalb als wesentliche Ursache für die Bildung flüssigen Leichenplasmas angesehen. Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß darüber hinaus ein $\text{pH} > 7$ und eine präfinal gute Zirkulation die Bildung flüssigen Leichenplasmas begünstigen.

7. LITERATUR

1. Abeta T.

Studies on the fluid blood in the cadaver

Japanese Journal of Legal Medicine 12, 554-584
(1958)

2. Amrani D.L. et al.

Separation and analysis of the major forms of
plasma fibronectin

Biochimica et biophysica Acta, 748, 308-320 (1983)

3. Astrup T.

Tissue activators of plasminogen

Federation Proceedings, 25, 42-51 (1966)

4. Bachmann L., Schmitt-Fumian W., Hammel R.,

Lederer K.

Size and shape of fibrinogen

I. Electron microscopy of the hydrated molecule

Die Makromolekulare Chemie, 176, 2603-2618 (1975)

5. Baur C., Liebhardt E., Troger H.-D., Schwarz H.,
Schuller E.

Auswertung von Wassergehaltsbestimmungen an
Leichenblut

Beitr. Gerichtl. Med. 36, 253-257 (1978)

6. Bayerle H., Marx R., Selhorst H.

Enzymologische Untersuchungen an Leichenblut

Virchows Archiv Bd.317, 449-460 (1949)

7. Belitser V.A. et al.

Quantitation of the inhibitory effect of fibrinogen
and its degradation products on fibrin
polymerization

Thrombosis Research, 27, 261-269 (1982)

8. Berg S.P.

Das postmortale Verhalten des Blutes

Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin 40,

1-75 (1950)

9. Berg S.P.

Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut als
Ausdruck des Todesgeschehens

Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin 54,
136-149 (1963)

10. Berg S.P.

Grundriß der Rechtsmedizin

12. Aufl.

Müller & Steinicke, München (1984)

11. Biggs R., MacFarlane R.G., Pilling J.

Observations on fibrinolysis. Experimental activity
produced by exercise or adrenaline

Lancet, 1, 403-405 (1947)

12. Bilezikian S.B.

Unique pattern of fibrinogen cleavage by human
leukocyte proteases

Blood, 50, 21-28 (1977)

13. Blakesly R.W., Boezi J.A.

A new staining technique for proteins in
polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue
G 250

Analytical Biochemistry 82, 580-582 (1977)

14. Blombäck B., Yamashina I.

On the N-terminal amino acids in fibrinogen and
fibrin

Arkiv Kemi 12, 299 (1958)

15. Blombäck B., Blombäck M.

The molecular structure of fibrinogen

Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 77-97 (1972)

16. Blombäck B. et al.

Primary structure of human fibrinogen and fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 5806-5820
(1973)

17. Blombäck B., Hessel B., Hogg D.

Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human
fibrinogen

Thrombosis Research 8, 639-658 (1976)

18. Blombäck B.
Fibrinogen and fibrin formation
in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 49-80
ed.: Markwardt F.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)
19. Brouardel E.T., Loye P.
Recherches sur la circulation pendant l'asphyxie
par submersion et sur le sang des noyés
Arch. Physiol. Norm. Path. 5-série I, 449-459
(1889)
20. Cash J.D. et al.
Adrenergic mechanisms in the systemic plasminogen
activator response to adrenaline in man
British Journal of Haematology 18, 487-494 (1970)
21. Caspary E.A., Kekwick R.A.
Some physicochemical properties of human fibrinogen
Biochem. J. 67, 41-48 (1957)
22. Chakrabarti R., Birks P.M., Fearnley G.R.
Origin of blood fibrinolytic activity from veins
and its bearing on the fate of venous thrombi
The Lancet, 1288-1290 (1963)

23. Cohen R.J. et al.

Alterations of fibrinolysis and blood coagulation
induced by exercise, and the role of β -adrenergic
receptor stimulation

The Lancet II, 1264-6 (1968)

24. Desnoyers P.C.

Indirect fibrinolytic agents

in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 273-316

ed.: Markwardt F.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

25. Doolittle R.F.

Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung

Spektrum der Wissenschaft 2, 58-69 (1982)

26. Duswald K.H.

Zur Pathobiochemie der Leukozyten-Elastase

Ernst-Giebeler, Darmstadt (1983)

27. Engvall E., Ruoslahti E.

Binding of soluble form of fibroblast surface
protein, fibronectin, to collagen

Int. J. Cancer 20, 1-5 (1977)

28. Engvall E., Ruoslahti E., Miller E.J.
Affinity of fibronectin to collagens of different
genetic types and to fibrinogen
J. Exp. Med. 147, 1584-1595 (1978)
29. Erickson L.A. et al.
The fibrinolytic system of the vascular wall
Clinics in Haematology 14(2), 513-530 (1985)
30. Fischer H.
Die Verwendung von Leichenblut für
Transfusionszwecke
Blut IX, 45-50 (1963)
31. Fowler W.E., Erickson H.P.
The trinodular structure of fibrinogen:
confirmation by both shadowing and negative stain
electron microscopy
Journal of Molecular Biology 134, 241-9 (1979)

32. Fracasso J.F., Rothschild A.M.

Alpha and beta adrenergic blocker-resistant release
of fibrinolytic activity from rat venae cavae by
epinephrine in vitro

Thrombosis and Hemostasis 49(1), 63 (1983)

33. Francis C.W., Marder V.J., Barlow G.H.

Plasmic degradation of crosslinked fibrin

J. Clin. Invest. 66, 1033-1043 (1980)

34. Francis C.W., Marder V.J., Martin S.E.

Plasmic degradation of crosslinked fibrin

I. Structural analysis of the particulate clot and
identification of new macromolecular soluble
complexes

Blood 56, 456-464 (1980)

35. Furlan M., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

I. Structural characterization of degradation
products

Biochim. Biophys. Acta 263, 631-644 (1972)

36. Furlan M., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

II. Further characterization of fragment D

Biochim. Biophys. Acta 310, 205-216 (1973)

37. Furlan M., Kemp G., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

III. Molecular model of the plasmin-resistant

disulfide knot in monomeric fragment D

Biochim. Biophys. Acta 400, 95-111 (1975)

38. Furlan M., Seelich T., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

IV. Identification of subunit chain remnants in
fragment Y

Biochim. Biophys. Acta 400, 112-120 (1975)

39. Furthmayer H., Timpl R.

Characterization of collagenpeptides by

sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide

electrophoresis

Analytical Biochemistry 41, 510-516 (1971)

40. Gaffney P.J., Brasher M.

Subunit structure of the plasmin-induced
degradation products of crosslinked fibrin
Biochimica et Biophysica Acta 295, 308-313 (1973)

41. Gaffney P.J.

Distinction between fibrinogen and fibrin
degradation products in plasma
Clinica Chimica Acta 65, 109-115 (1975)

42. Gaffney P.J., Joe F., Mahmoud M.

Giant fibrin fragments derived from crosslinked
fibrin;
structure and clinical implication
Thrombosis Research 20, 647- 662 (1980)

43. Gardlund B et al.

Primary structure of human fibrinogen
European Journal of Biochemistry 77, 595-610 (1977)

44. Gollwitzer R. et al.

Chemical and immunological properties of reduced
and alkylated polypeptide chains of bovine
fibrinogen
European Journal of Biochemistry 28, 497-506 (1972)

45. Gollwitzer R., Hafter R., Timpl H., Graeff H.
Immunological assay for a carboxyterminal peptide
of the fibrinogen α -chain in normal and
pathological human sera
Thrombosis Research 11, 859 (1977)
46. Graeff H., Hafter R., Bachmann L.
Subunit and macromolecular structure of circulating
fibrin from obstetrical patients with intravascular
coagulation
Thrombosis Research 16, 313- 328 (1979)
47. Habara T.
Studies on fluidity of blood on the basis of
fibrinolysis. Part IV
Catecholamine concentrations (especially of
adrenaline) and fibrinolytic phenomenon in normal
and post-mortem blood of man and animals
Japanese Journal of Legal Medicine 21 (4), 424-444
(1967)

48. Hafter R., Graeff H.

Estimation of soluble fibrin monomer complexes by
agarose gel filtration

In: Progress in Chemical Fibrinolysis and
Thrombolysis, Vol.2,

hrsg. von Davidson J.F., Samama M.M.,
Desnoyers P.C.

Raven Press, New York (1976)

49. Hafter R., v. Hugo R., Graeff H.

Markerfunktion von Fibrinderivaten verschiedener
Entstehungsart

In: Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber

hrsg.: Schimpf K.

Schattauer, Stuttgart, 121-124 (1980)

50. Hafter R., Graeff H.

Homologues of fibrin X oligomers.

In: Fibrinogen - Recent biochemical and medical
aspects,

hrsg. von Henschen A., Graeff H., Lottspeich F.

Walter de Gruyter, Berlin - Hawthorne NY (1982)

51.Hafter R., Klaubert E., Graeff H.

Characterization of crosslinked high molecular
weight fibrin derivatives from in vitro and in vivo
(ascitic fluid) material

in: Fibrinogen- Structure,Functional Aspects,

Metabolism Vol.2

Walter de Gruyter & Co., Berlin/New York (1983)

52.Hafter R. et al.

Crosslinked fibrin derivatives and fibronectin in
ascitic fluid from patients with ovarian cancer
compared to ascitic fluid in liver cirrhosis

Thrombosis Research 35, 53-64 (1984)

53.Hafter R., Schroeck R., von Hugo R., Graeff H.

Measurements of crosslinked fibrin derivatives in
plasma and ascitic fluid with monoclonal antibodies
against D-dimer using EIA and latex test

Scand. J. clin. Lab. Invest. 45, Suppl.178, 137-144
(1985)

54. Hall C., Slayter H.

The fibrinogen molecule: its size, shape and mode
of polymerization

Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 5,
11-15 (1959)

55. Halse T.

Fibrinolyse. Eine klinische und experimentelle
Studie über die 4. Phase der Blutgerinnung
Freiburg: Editio Cantor GmbH (1948)

56. Halse T.

Das fibrinolytische Potential. Enzymologie,
Pathologie und Klinik
Medizinische 2044-2054 und 2102-2108 (1958)

57. Harms D.

Postmortale Fibrinolyse beim Menschen
Veröffentlichungen aus der morphologischen
Pathologie, 87. Heft,
Gustav Fischer, Stuttgart (1971)

58. Hawiger J., Niewiarowski S., Gurewich V.,
Thomas D.P.

Measurement of fibrinogen and fibrin degradation
products in serum by staphylococcal clumping test
J. Lab. Clin. Med. 75, 93-108 (1970)

59. Hawiger J., Kloczewiak M., Timmons S.

Interaction of fibrinogen with staphylococcal
clumping factor and with platelets

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin
ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,
Vol. 408, 521-535 (1983)

60. Hawkey C.M. et al.

Changes in blood catecholamine levels and blood
coagulation and fibrinolytic activity in response
to graded exercise in man

British Journal of Haematology 29, 377-384 (1975)

61. Henschen A.

Number and reactivity of disulfide bonds in
fibrinogen and fibrin

Arkiv Kemi 22, 355 (1964)

62. Henschen A., Blombäck B.

Amino acid composition of human and bovine
fibrinogen and fibrin

Arkiv Kemi 22, 347-354 (1964)

63. Henschen A.

Fibrinogen - Blutgerinnungsfaktor I

Hämostaseologie 1, 30-40 (1981)

64. Hörmann H., Gollwitzer R.

Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen
und -fibrin

Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische
Chemie 346, 21-41 (1966)

65. Hörmann H.

Fibronectin - Mediator between cells and connective
tissue

Klinische Wochenschrift 60, 1265-1277 (1982)

66. Hörmann H., Seidl M., Richter H.

Fibrin binding and transamidation reactive domains
of fibronectin

in: Fibrinogen: Recent Biochemical and Medical
Aspects

Walter de Gruyter, Berlin, New York 389-395 (1982)

67. Im Obersteg J.

Tod und Blutgerinnung

Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin

43, 177-216 (1954)

68. Iwanaga S.

Bovine plasma cold-insoluble globulin: cross
structure and function

Annals New York Academy of Sciences (1978)

69. Kaneko H.

Studies on fluidity of blood on the basis of
fibrinolysis. Part XI

Studies on the releasing mechanism of plasminogen
activator from vascular wall by means of regional
perfusion

Japanese Journal of Legal Medicine 33 (3), 201-209
(1979)

70. Kauert G., Liebhardt E., Spann W.

Ermittlung eines "Agonie-Indexes" aus postmortalen
Adrenalinspiegeln

Acta medicinae legalis et socialis 32, 55-58 (1982)

71. Kaulla K.N. von

Nonenzymatic activation of the fibrinolytic enzyme
system

Federation Proceedings 25, 57-62 (1966)

72. Klar E., Heene D.L.

Fibronectin

Klinische Wochenschrift 62, 963-974 (1984)

73. Klaubert W., Bushe Ch. et al.

Verlauf und prognostische Bedeutung von
Fibrin(ogen)- Reaktionsprodukten während und nach
kardio-pulmonaler Reanimation
in Vorbereitung

74. Kline D.L.

Chemistry and biochemistry of the fibrinolytic
system

Federation Proceedings 25, 31-33 (1966)

75. Kokavec M., Barta E., Krsek H., Bialik V.,
Neuwerth A.

Der Anteil der Nebennieren an der Entstehung
einiger Veränderungen des Blutes während der
mechanischen Asphyxie

Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin
64, 49-55 (1968)

76. Kopec M., Latallo Z.S.

Fibrinogen and fibrin degradation products
in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 81-105
ed.: Markwardt F.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

77. Laiho K., Penttilä A.

Autolytic changes in blood cells and other tissue
cells of human cadavers I. Viability and ion
studies

Forensic Science International 17, 109-120 (1981)

78. Landmann H.

Biochemistry of the factors of the fibrinolytic system

in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 3-48

ed.: Markwardt F.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

79. Lebreton de Vonne T., Mouray H.

Human α_2 -macroglobulin and its antitryptic and antithrombin activities in serum and plasma

Clin. Chim. Acta 90, 83-85 (1978)

80. Lucas M.A., Fretto L.J., McKee P.A.

The relationship of fibrinogen structure to plasminogen activation and plasmin activity during fibrinolysis

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol. 408, 71-91 (1983)

81. Lund A.

Adrenaline and noradrenaline in post-mortem blood

Medicine, science and the law 4, 194-197 (1964)

82. Manucci P.M. et al.

Mechanism of plasminogen activator and factor VIII
increase after vasoactive drugs

British Journal of Haematology 30, 81-93 (1975)

83. Marder W.J., Shulman N.R., Carroll W.R.

High molecular weight derivatives of human
fibrinogen produced by plasmin

I. Physicochemical and immunological
characterization

Journal of Biological Chemistry 244, 2111-2119
(1969)

84. Marder V.J., Francis C.W.

Plasmin degradation of crosslinked fibrin

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin
ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,
Vol. 408, 397-406 (1983)

85. Mc Donagh J., Messel H., Mc Donagh R.P., Murano G.,

Blombäck B.

Molecular weight analysis of fibrinogen and fibrin chains by an improved sodium dodecylsulphate gel electrophoresis method

Biochimica et Biophysica Acta 257, 135-142 (1972)

86. Mihalyi E.

Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragmentation of fibrinogen

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol. 408, 60-70, (1983)

87. Mills D., Karparkin S.

Heterogeneity of human fibrinogen: possible

relation to proteolysis by thrombin and plasmin as

studied by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Biochemical and Biophysical research communications

40, 206-211, (1970)

88. Mizutani Y., Yamada T.

Studies on the fluidity of cadaveric blood in
sudden death

- Fluid blood in the cadaver from the viewpoint of
clotting function -

Japanese Journal of Legal Medicine 32 (5), 277-284
(1978)

89. Mole R.H.

Fibrinolysin and the fluidity of the blood post
mortem

The Journal of Pathology and Bacteriology 60,
413-427 (1948)

90. Mortensen J.Z., Joergensen K.A.

Antithrombin III

Danish Medical Bulletin 30, 100-105 (1983)

91. Mosesson M.W., Amrani D.L.

Review: The structure and biologic activities of
plasma fibronectin

Blood 56(2), 145-158 (1980)

92. Muellertz S.

Fibrinolytic activity of human blood after death

Acta physiol. scand. 27, 265-271 (1953)

93. Muellertz S.

Fibrinolysis: An overview

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 10(1), 1-5

(1984)

94. Nossel H.L., Younger L., Wilner G.D., Procupez T.,

Canfield R.E., Butler V.P.

Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A

Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2350-2353 (1971)

95. Nossel H.L., Yudelman I., Canfield R.E.,

Butler V.P., Spandonis K., Wilner G.D.,

Quereshi G.D.

Measurement of fibrinopeptide A in human blood

Journal of Clinical Investigation 54, 43-53 (1974)

96. Nossel H.L., Hurlet-Jensen A., Liv Y.C., Koehn A.,
Canfield R.E.

Fibrinopeptide Release from Fibrinogen

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol. 408, 269-278 (1983)

97. Ogston D.

The Physiology of Hemostasis

Croom Helm, London and Canberra (1983)

98. Ohlsson K., Ohlsson I.

The neutral proteases of human granulocytes

European Journal of Biochemistry 36, 473-481 (1973)

99. Ohlsson K., Ohlsson I.

The neutral proteases of human granulocytes.

Isolation and characterization of granulocyte

elastase

European Journal of Biochemistry 42, 519 (1974)

100. Pearlstein E.

Fibronectin: A review of its structure and
biological activity

Molecular and Cellular Biochemistry 29, 103-128

(1980)

101. Petri K.

Untersuchungen zum Abbau von Fibrinogen und Fibrin
mit Leukozyten-Elastase

Dissertation aus der I. Frauenklinik Uni München

(1980)

102. Pina-Cabral J.M., Custodio R.

Blood catecholamine levels, factor VIII and
fibrinolysis after therapeutic electroshock

British Journal of Haematology 28, 371-380 (1974)

103. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

The effect of plasmin on the subunit structure of
human fibrinogen

Journal of Biological Chemistry 247, 636-645

(1972)

104. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

The effect of plasmin on the subunit structure of
human fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 4574-4583

(1973)

105. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

Subunit structure of fragment D from fibrinogen and
cross-linked fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 4584-4590

(1973)

106. Plow E.F., Edgington T.S.

An alternative pathway for fibrinolysis

The Journal of Clinical Investigation 56, 30-38

(1975)

107. Plow E.F.

Leukocyte elastase release during blood

coagulation

The Journal of Clinical Investigation 69, 564-572

(1982)

108. Plow E.F., Edgington T.S., Cierniewski C.S.

Immunochemical Analysis of the Conformation of
Fibrinogen

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol.408 , 44-59 (1983)

109. Ponari O. et al.

Effect of alpha- and beta-blocking drugs on the
clotting and fibrinolytic response to venous stasis
in man

British Journal of Haematology 24, 463-470 (1973)

110. Rabinovitz M., Schen R.J., Fisher I.L.

Fibrinolytic split products in cadaver blood from
cases of sudden or violent death

Journal of Forensic Medicine 14, 138-145 (1967)

111. Rijken D.C. et al.

Relationship between tissue plasminogen activator
and the activators in blood and vascular wall

Thrombosis Research 18, 815-830 (1980)

112. Ruoslahti E., Engvall E.

Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen

Biochimica et Biophysica Acta 631, 350-358 (1980)

113. Ruoslahti E. et al.

Alignment of biologically active domains in the fibronectin molecule

Journal of Biological Chemistry 256, 7277-7281 (1981)

114. Schleyer F.

Quantitative Untersuchungen über den Fibrinogenschwund im Leichenblut

Arch. exper. Path. u. Pharmacol., Bd. 211, 292-302 (1950)

115. Schwartz M.L. et al.

The effect of fibrin-stabilizing factor on the subunit structure of human fibrin

The Journal of Clinical Investigation 50, 1506-1513 (1971)

116. Shapiro A.L., Viñuela E., Maizel J.V.

Molecular weight estimation of polypeptide chains
by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels

Biochemical and Biophysical Research

Communications

28, 815-820 (1967)

117. Sherry S., Lindemayer R.J., Fletcher A.P.,

Alkjaersig N.

Studies on enhanced fibrinolytic activity in man

Journal of Clinical Investigation 38, 810 (1959)

118. Slayter H.S.

Electron microscopic studies of fibrinogen.

Structure: Historical perspectives and recent
experiments

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol. 408, 131-145 (1983)

119. Stenberg B. et al.

Effect of venous stasis on vessel wall

fibrinolysis

Thrombosis and Haemostasis 51(2), 240-242 (1984)

120. Sternberg J.C.

Monitoring the precipitin reaction using rate
nephelometry

International Clinical Products Review , 16-23,
July/Aug.1984

121. Sterrenberg L. et al.

Purification and properties of early (X-like) and
late (D-like) fibrinogen fragments, produced by
leucocyte elastase

in: Fibrinogen- Structure, Functional Aspects,
Metabolism Vol.2

Walter de Gruyter & Co., Berlin/New York (1983)

122. Sterrenberg L. et al.

Anticoagulant properties of purified X-like
fragments of human fibrinogen produced by
degradation with leucocyte elastase

Thrombosis and Haemostasis 51(3), 398-402 (1984)

123. Takeichi S., Wakasugi C., Shikata I.

Fluidity of cadaveric blood after sudden death:

Part I

The American Journal of Forensic Medicine and
Pathology

Volume 5, Number 3, 223-227 (1984)

124. Takeichi S. et al.

Fluidity of cadaveric blood after sudden death:

Part II

The American Journal of Forensic Medicine and
Pathology

Volume 6, Number 1, 25-29 (1985)

125. Thompson A.R., Harker L.A.

Manual of Hemostasis and Thrombosis ed.3

F.A. Davis Company, Philadelphia (1983)

126. Todd A.S.

The histological localisation of fibrinolysin
activator

Journal of Pathology and Bacteriology 78, 281-283
(1959)

127. Vaughn J.

Blood transfusion in the U.S.S.R. : Notes on a
short visit

Transfusion 7, 212-229 (1967)

128. Vogel R.

Untersuchungen über die Blutgerinnung und ihre
Bedeutung für die gerichtliche Medizin

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 8, 180-201 (1926)

129. Wachholz L.

Der Leichenbefund beim Ertrinkungstod

Vjschr. gerichtl. Med. 3. F. 54, 1-8 (1917)

130. Weber K., Osborn M.

The reliability of molecular weight determinations
by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
electrophoresis

The Journal of Biological Chemistry 244, 4406-4412
(1969)

131. Witt I.

Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse

Chemie, Weinheim (1975)

132. Yudin S.S.

Transfusion of cadaver blood

Journal of the American Medical Association 106,

997-999 (1936)

133. Yudin S.S.

Transfusion of stored cadaver blood

Lancet, 361-366 (1937)

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. W. Klaubert für die zahlreichen Anregungen beim experimentellen Teil der Arbeit und für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. R. Gollwitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Hilfe bei Bestimmung der F-CB3-Werte.

Herrn Dr. R. Hafter, Klinikum Rechts der Isar, TU München, danke ich für die Hilfe bei der Bestimmung der DD-Werte.

Herrn Dr. T. Gilg, Institut für Rechtsmedizin, LMU München, danke ich für die Hilfe bei der Beschaffung des Probenmaterials.

Des weiteren möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir auf sonstige Art und Weise die Durchführung dieser Arbeit erleichterten und ermöglichten.

Lebenslauf

- 17.08.1958 Geboren in Ingolstadt als Sohn von
Anna Theresia Schönbauer, geb. Riha und
Dr. med Otto Schönbauer, Arzt für
Allgemeinmedizin
- 1964-1968 Volksschule in Stammham
- 1968-1978 Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt
- 1978 Abitur
- 1978-1979 Wehrdienst
- 1979-1980 Laborant bei Dr. med S. Spranger, Arzt für
Labormedizin in Ingolstadt
- WS 1980/81 Beginn des Medizinstudiums an der LMU
München
- August 82 Ärztliche Vorprüfung
- August 83 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- August 85 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Oktober 86 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

